

生命機能調節化学研究室（研究室紹介）

著者	清水 文一
著者別名	Shimizu Bunichi
雑誌名	生命科学
号	2009
ページ	73-77
発行年	2010-03-31
URL	http://id.nii.ac.jp/1060/00000114/



生物機能調節化学研究室

(第 25 研究室 清水 文一 准教授)

Laboratory for Biofunctional and Bioregulation Chemistry

二次代謝と植物の進化

植物界では、二次代謝と呼ばれる物質生産（物質変換）によって非常に多様な構造をもつ化合物が作られる。二次代謝能を植物はいかに獲得したのであろうか。

植物は草食動物に補食されながら進化した。その結果、動物の代謝や神経系を攪乱する成分を作る機能を持つものが現れた。また動物を捕食者としてではなく、自らの生殖に利用するものも現れた。花粉媒介者や種子運搬者を惹きつける香気成分や色素を生産することで、動物を利用することが可能になった。さらには微生物に対しても、増殖を制御もしくは排除するための抗菌成分を多くの植物が生産する。植物の二次代謝は他の生物種との相互作用、環境応答と密接に関係を保ちながら進化してきたと考えられる。

植物の陸上への進出とフェニルプロパノイド経路

植物二次代謝の進化を考える上で重要な事件がある。植物の水中から陸上への進出である。植物は陸上に進出する際、水中では必要のなかった、重力に抗して立ち上がる能力獲得の必要性に直面したに違いない。少しでも背の高い形質を獲得し、より多くの太陽エネルギーを受けることで他者との競争で有利になる。この競争の過程で、水中植物や蘚苔類には

ない強靱な骨格を作る機能を獲得した植物が現れた。これらは維管束植物と呼ばれている。維管束植物は、陸上で不足しがちな水分を保持し、自らの巨大な体を支えるために、リグニンと呼ばれる強靱な物質を細胞壁に蓄積する。

リグニンは芳香環を有する構成単位からなり強固な構造体を形成する。リグニンの構成単位はフェニルプロパノイド経路と呼ばれる代謝経路から供給される。植物の生産する木質の大部分がこの経路から生産されている。現在、化石燃料として利用されている石油や石炭も、太古の植物のフェニルプロパノイド代謝の産物といえる。

フェニルプロパノイド経路はフェニルアラニンを出発原料に、フェニルアラニンアンモニアライエース (PAL) を始発酵素とする経路で、 C_6-C_3 単位をもつ桂皮酸とその類縁化合物を生産する (Fig. 1)。フラボノイドはそこから派生する化合物群の一つで、花や葉の色素成分として知られるポリフェノール化合物の一種である。フェノール性化合物の多くがそうであるように、フラボノイドも生体に有害な紫外光の吸収を示す。シロイヌナズナをはじめとした多くの植物では強い日光やストレスを受けると、フラボノイドの蓄積が見られる。これは植物が自らの体を紫外光の害から守るために生合成し蓄積す

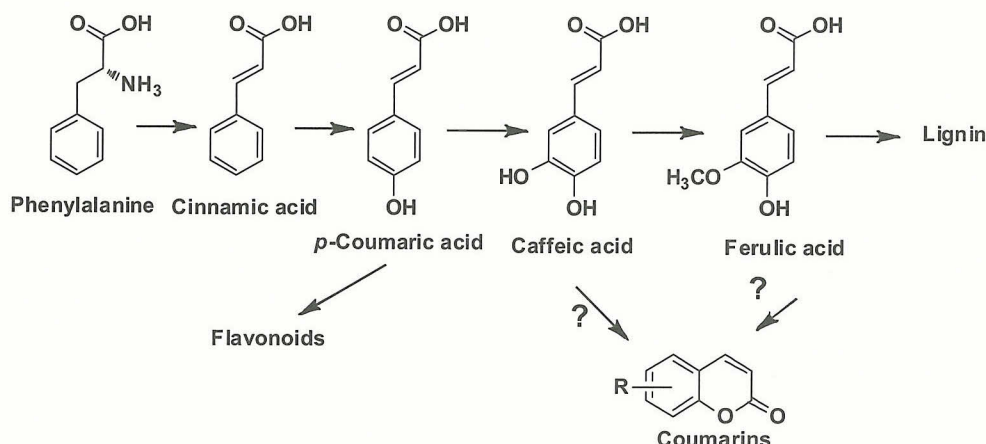


Fig. 1 Phenylpropanoid pathway and secondary metabolism in plants

るものと考えられる。

クマリン化合物について

クマリン化合物は 2H-1-benzopyran-2-one を基本構造にもち、植物や糸状菌、放線菌の二次代謝産物の中に見られる。とくに植物界には広く分布しており、多様な構造をしたものが報告されている。¹⁾ また抗酸化作用と広い抗菌スペクトルを有し、病原の侵入や傷害で植物組織に誘導蓄積することから、植物の生体防御に関与していると考えられている。

もっとも単純なクマリン化合物であるクマリンはサクラの花や桜餅の甘い香りの主成分である (Fig. 2)。スイートクロー

バーにも含まれており、干し草の甘い香りとして古くから研究されてきた。牛や羊にスイートクローバーを牧草として与えたときに出血が止まらず死に至る病気が発生したことから注目され研究が始まった。これはスイートクローバーに含まれるクマリンが微生物による代謝を受け、抗血液凝固作用のあるジクマロールへと変換され毒性を示した結果であると判明した。のちにジクマロールをリードとして抗血液凝固薬剤であるワルファリンが開発されている。

フラノクマリンはセリ科植物などに見られるクマリン化合物で、光反応性を示す。フラノクマリンの一つ、ソラレンは

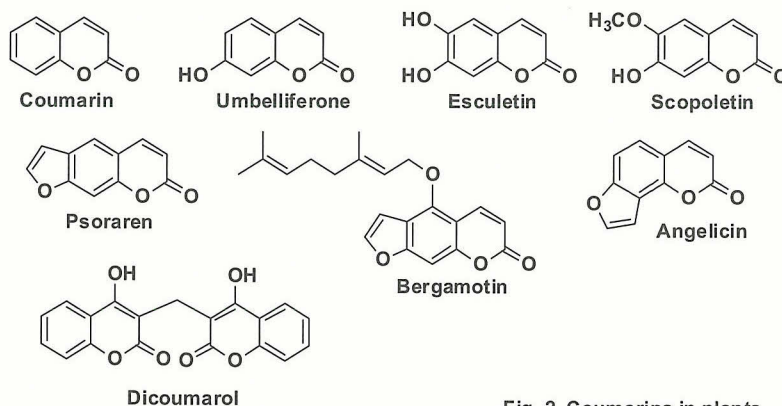


Fig. 2 Coumarins in plants

乾癬治療薬として使用される。またベルガモチンはかんきつ類に含まれ、ヒトの薬剤代謝酵素シトクローム P450 モノオキシゲナーゼ (CYPs) に対する阻害活性を示す。このようにクマリン化合物の中にはヒトに対してさまざまな生理活性を持つものが存在する。

クマリン化合物の生合成

植物がこれほど多様なクマリン化合物を生合成する意味とは何であろうか。

当研究室では、土壌糸状菌フザリウムのうちで非病原性の系統によってサツマイモに誘導される、サツマイモつる割れ病に対する抵抗性の研究を行っている。その過程で菌との相互作用によってサツマイモやサツマイモの近縁種であるソライロアサガオに、クマリン骨格を持つスコポレチン (7-ヒドロキシ-6-メトキシクマリン、Fig. 2) がグルコース配糖体スコポリンとして誘導蓄積することを見いだした。²⁾ スコポレチン蓄積と抵抗性誘導には密接な関係が見られたことから、植物体が獲得した病害抵抗性にスコポレチンが何らかの役割を持っていることが考えられた。病原の侵入ストレスで誘導されるならば、その逆でスコポレチン生合成能を欠損したソライロアサガオの病害抵抗性はどのように変化するのだろうか？この疑問に答えるため当研究室では、クマリン化合物の生合成研究を行っている。

植物の香り改変や病害抵抗性の付与な

どのための基礎的な知見として、クマリン化合物の生合成は古くから注目されてきた。実際に、天然物化学の教科書には必ずと言っていいほどふれられている。クマリン化合物は C_6-C_3 構造を持つことから、フェニルプロパノイド経路から生合成されるであろうことが容易に想像できる (Fig. 1)。フェニルプロパノイド経路上の各種桂皮酸類縁体の芳香環のオルト位に水酸基が導入され、側鎖のトランス-シス異性化、ラクトン化を経て、クマリン化合物が生合成される。ところで、フェニルプロパノイド経路では桂皮酸の芳香環 3'-, 4'-, 5'-位はそれぞれ CYPs によって水酸化されることが知られている。³⁾ しかしこれまでの研究にもかかわらず、オルト位水酸化酵素に関しては芳香環の他の位置と同様に CYP が触媒しているのではないかという推測にとどまっているだけで、同定には至っていなかった。⁴⁾

クマリン生合成経路を明らかにするために、すでにゲノム情報が解読され研究の基盤が整っているモデル植物シロイヌナズナを用いた。以前はシロイヌナズナにおけるクマリン化合物の詳細な分析は行われていなかったが、われわれはシロイヌナズナの根に $1 \mu\text{mol/g}$ に達する高レベルでスコポリンが蓄積していることを見いだした。また地上部でもフザリウムやオーキシシン活性を持つ 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を処理することによってスコポリン内生量が上昇した。⁵⁾ そこでシロイヌナズナ中でのスコポレチ

ン生合成経路の研究を進めた。

まず始めに、フェニルプロパノイド経路上にある既知の酵素のいくつかに注目しそれらのT-DNA挿入欠損変異株を分析、場合によっては遺伝子の転写産物を組換え酵素として発現させ、その酵素活性を検討することで、スコポレチン生合成がフェニルプロパノイド経路のどの部分から派生してくるのかを探った。その結果、*p*-クマロイルシキミ酸の 3'-位を水酸化して、カフェオイルシキミ酸へと変換する水酸化酵素 CYP98A3 と、カフェオイル-CoA の 3'-位水酸基をメチル化するカフェオイル-CoA メチル基転移酵素 (CCoAOMT1) がスコポレチン生合成に深く関わっていることが分かった (Fig. 3)。このことからスコポレチン生合成はフェルロイル-CoA もしくはフェルラ酸以降の代謝物から分岐して進行するものと考えられた。

オルト位水酸化酵素はいかなる酵素なのであろうか。ここにたどり着くためのいくつかの手がかりがあった。筆者らの¹⁸O₂取り込み実験の結果から、クマリン骨格の 1-位酸素は分子状酸素由来であったことから、オルト位水酸化酵素は分子状酸素を用いた反応を触媒することが示された。このような酵素にはこれまで予想されてきた CYP のほかに、2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (2OGD)、フラビンモノオキシゲナーゼが挙げられる。またスコポレチン/スコポリンは地下部で蓄積しており、地上部でも 2,4-D 等で誘導蓄積が見られる点も手がかりとなった。目的のオルト位水酸化酵素はこのスコポレチン/スコポリンの蓄積パターンと同じ挙動を示すことが予想された。公開されている MPSS (<http://mpss.udel.edu/at>) などのシロイヌナズナの遺伝子発現データベースから、以上の条件を満たす候補

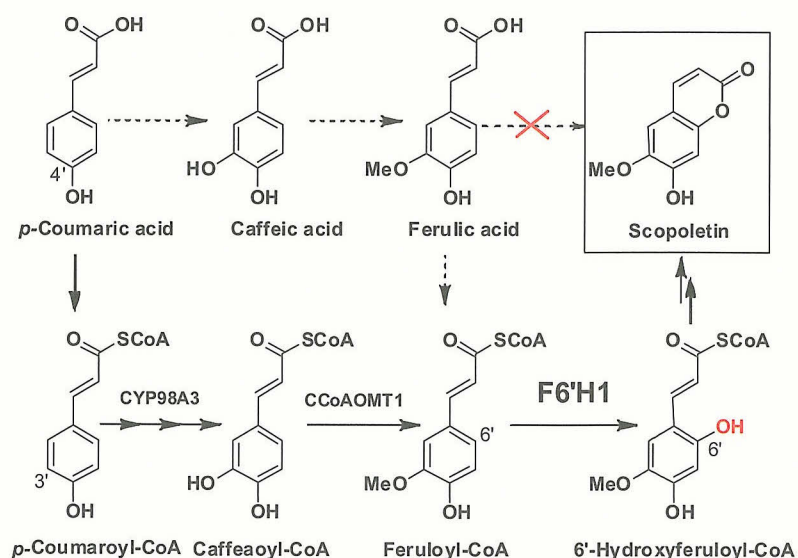


Fig. 3 Biosynthetic pathway of scopoletin in *Arabidopsis thaliana*.

となる遺伝子の絞り込みを行った。そして、複数の候補遺伝子の T-DNA 挿入変異株のスコポレチン/スコポリン内生量を定量したところ、その中から 2OGD をコードする F6'H1 遺伝子欠損株の根にはスコポレチン/スコポリンがほとんど蓄積していないことを見いだした。さらに、F6'H1 酵素活性を検討する際に筆者らは、これまでの研究で基質と考えられてきたフェルラ酸に加えて CCoAOMT1 の生成物であるフェルロイル-CoA を F6'H1 の候補基質として用いた。その結果、F6'H1 は鉄(II)イオン、2-オキソグルタル酸依存的にフェルロイル-CoA に対してオルト (6'-) 位水酸化活性を示した。その一方でフェルラ酸に対しては活性を示さなかった。以上の結果から F6'H1 がスコポレチン生合成におけるオルト位水酸化酵素であると結論した (Fig. 3)。⁶⁾ これまでの予想にとらわれず候補遺伝子として CYP 以外の酵素も視野に入れたこと、フェルラ酸だけでなくフェルロイル-CoA を基質として用いたこと、そしてシロイヌナズナの研究基盤を多いに利用できたことが目的酵素同定の鍵となった。

興味深いことに、我々が同定したシロイヌナズナ由来 F6'H1 は、シンナモイル-CoA、*p*-クマロイル-CoA、カフェオイル-CoA に対しては活性を示さなかった。この基質特異性はシロイヌナズナがフェルロイル-CoA 由来のスコポレチンをほぼ単一で蓄積していることと一致している。一方、植物界には桂皮酸、*p*-クマル酸、カ

フェ酸それぞれから生合成されていると思われる置換様式のクマリン化合物が存在する。公開されている植物 EST データベースを検索すると F6'H1 ホモログが他の植物に存在していることから、これらホモログによってそれぞれの植物でクマリン化合物の生合成に関わっているものと思われる。これらを明らかにしてゆくことで、植物が進化の過程でどのようにしてクマリン化合物という物質を獲得し、その機能を利用してきたのかを知ることができる。またクマリン生合成の鍵酵素である F6'H1 をシロイヌナズナで同定したことで、今後、植物におけるクマリン化合物の機能を解明し植物の耐病性、ストレス耐性や香りといった品質の向上に貢献できるのではないかと期待している。

参考文献

- 1) *Nat. Prod. Rep.* 1989, **6**, 591-624.
- 2) *Z. Naturforsch C.* 2005 **60**, 83-90.
- 3) *Biochem Soc Trans.* 2006, **34**, 1192-1198.
- 4) *Phytochemistry Reviews.* 2006, **5**, 293-308.
- 5) *Phytochemistry* 2006, **67**, 379-386.
- 6) *Plant J.* 2008, **55**, 989-999.